第32卷 第1期　　昆 虫 学 报　　Vol. 32, No. 1
1989年2月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Feb., 1989

家蝇对二氯苯醚菊酯的抗性及增效磷的增效作用 II：氧化代谢

李 晶　冯国蕾　龚坤元
（中国科学院动物研究所，北京）

摘要　氧化代谢的增强是引起家蝇对二氯苯醚菊酯产生抗性的因素之一。抗性家蝇多功能氧化酶的萘羟化活性、对二氯苯醚菊酯的氧化代谢能力和微粒体细胞色素 P_{450} 含量分别是正常家蝇的 2、1.48、1.33 倍。正常家蝇和抗性家蝇细胞色素 P_{450} 在对增效磷（SV_1）和氧化胡椒基丁醚（Pb）的敏感性上也存在着差异。SV_1 与多功能氧化酶专一性抑制剂 Pb 一样，对该酶系催化的萘羟化活性及二氯苯醚菊酯的氧化代谢有明显的抑制作用，这种抑制作用是 SV_1 在家蝇体内对二氯苯醚菊酯增效的机理之一。SV_1 对氧化代谢的抑制与它和微粒体细胞色素 P_{450} 相互作用形成非活性复合体有关。

关键词　家蝇　二氯苯醚菊酯抗性　多功能氧化酶活性　细胞色素 P_{450}　SV_1 抑制

除虫菊酯类农药的初级解毒代谢包括氧化和水解二条主要途径（Söderlund, 1983）。由解毒代谢增强而引起的抗性涉及到氧化和水解两种作用（Dai & Sun, 1984）。动物体内催化除虫菊酯类农药氧化代谢的酶为多功能氧化酶，由该酶系活性升高所引起的抗性可利用增效剂对其抑制来克服。

增效磷（SV_1）为杀虫剂广谱增效剂。Oppenoorth(1971) 提出增效磷作为多功能氧化酶抑制剂来起增效作用。以后有许多报道都证实了这一结论（Ishaaya, 1983）。SV_1 对多功能氧化酶抑制作用方式还未见深入的研究报道。Wilkinson (1971) 曾提出有机硫逐磷酸酯可做为微粒体氧化酶的替换底物抑制正常的氧化解毒作用，SV_1 结构正属于这类化合物，它的作用方式可能相似。

我们比较了 SV_1 和多功能氧化酶特异性抑制剂 Pb 在正常和抗性品系家蝇体内对二氯苯醚菊酯的增效情况，测定了 SV_1 对多功能氧化酶和细胞色素 P_{450} 的抑制作用，以了解氧化代谢在菊酯类农药抗性家蝇中的作用和 SV_1 对这类农药的增效机理，寻求克服抗性的可能途径。

材 料 与 方 法

（一）实验材料

1. 家蝇（*Musca domestica vicina*）

正常品系（NP）：未接触过杀虫剂的家蝇。

二氯苯醚菊酯抗性品系（2Cl-R）：自 1979 年起，对南口地区家蝇连续点滴处理二氯苯醚菊酯约 150 代，培养出的抗性品系。

本文于 1986 年 7 月收到。

2. 药品及试剂

二氯苯醚菊酯：英国 Imperial 公司产品，纯度为 91.4%。

增效磷 (SV_1)：由动物研究所药剂毒理实验室自行合成，纯度在 95% 以上。

氧化胡椒基丁醚 (Pb)：英国产(国内分装)，纯度为 80%。

NADP：美国 Sigma 公司产品和上海生化所生化试剂厂产品。

葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P)：英国 LDH 公司和美国 Sigma 公司产品。

G-6-P 脱氢酶 (40μg/ml)：美国 Sigma 公司产品。

其他试剂均为分析纯。

(二) 方法

1. 毒力测定

用丙酮做溶剂配所需系列浓度的药液。用点滴法测定药剂对家蝇的 LD_{50}。做增效实验时，将一定浓度的增效剂丙酮溶液提前 1 小时滴 1μl 于腹部后，再进行杀虫剂的毒力测定。用电子计算机概率单位法计算致死中量 LD_{50} (龚坤元等，1964)。求增效比 (Synergist Ratio，简称 SR) 和增效差 (Synergist Difference，简称 SD) (Brindley，1977)。每次点滴不少于 5 个浓度，每个浓度 20 头以上家蝇。

2. 多功能氧化酶制备及测定

参照 Hansen 和 Hodgson (1971) 的方法有所修改。将羽化 7—8 天雌蝇在液氮中冷冻分离腹部。0℃ 在 0.35mol/L KCl-0.05mol/L Tris-HCl(pH7.9) 缓冲液中以 300 腹/10ml 浓度匀浆，12100g 离心 15 分钟，取上清液做为酶源。按 Hanson 和 Hodgson (1971)方法测定萘羟化活性。

3. 微粒体细胞色素 P_{450} 的制备及含量测定

取 4—5 天雌蝇腹部，参照 Kulkarni & Hodgson (1975) 方法制备微粒体。采用 Omura & Sato (1964) 方法测定 CO 差光谱以确定微粒体细胞色素 P_{450} 含量。

4. 二氯苯醚菊酯代谢活性测定

取 4 天雌蝇腹部，以 20 腹/ml 浓度在 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.9) 缓冲液中匀浆。0℃12100g 离心 15 分钟，取上清液做为酶源。

代谢活性的测定参考 Soderlund (1983) 等的方法，含有氧化和水解两种酶活性反应液为：5×10^{-2}mol/L G-6-P、5×10^{-3}mol/L $MgCl_2$、5×10^{-4}mol/L NADP，0.2UG-6-P 脱氢酶、0.05mol/L Tris-HCl(pH7.9) 缓冲液及各种不同抑制剂。加入二氯苯醚菊酯及酶，在 30℃ 保温 1 小时，加入丙酮终止反应。用正己烷抽提残余的二氯苯醚菊酯，气相色谱法测定正己烷抽提液中二氯苯醚菊酯的含量。

气相色谱条件：电子捕获检测器测定，柱长 2 米，柱温 195℃，进样口及检测器温度都为 230℃，氮载气流速 55ml/分，填充料 2% SE-30，Chrom AW-DMCS80—100 目。

结果与讨论

1. 毒力测定

SV_1、Pb 对二氯苯醚菊酯在家蝇体内的增效情况见表 1。

SV_1 与多功能氧化酶抑制剂 Pb 一样，对二氯苯醚菊酯有明显的增效作用。当使用浓

表 1　SV_1、Pb 在家蝇体内对二氯苯醚菊酯的增效作用

品　系		对　照	0.1%SV_1	1%SV_1	0.1%Pb	1%Pb
NP	LD_{50}	0.00608	0.00175		0.00170	
	SR		3.47		3.57	
	SD		0.00403		0.00438	
2Cl-R	LD_{50}	5.90	1.51	0.713	1.11	0.788
	SR		3.92	8.27	5.32	7.49
	SD		4.39	5.19	4.79	5.11

正常品系家蝇用 1%SV_1 或 Pb 处理时，有轻微击倒作用，故未用该浓度做增效实验。

度为 0.1% 时，Pb 的增效作用要比 SV_1 强一些； 增效剂浓度提高到 1% 后，SV_1 的增效程度比 Pb 稍高。由此表明 SV_1 对多功能氧化酶有一定的抑制作用，这种抑制作用是 SV_1 在家蝇体内对二氯苯醚菊酯增效的一个原因。

根据 Brindley (1977) 报道，比较不同品系昆虫增效作用的 SD 值可较准确地反映出代谢在抗性中所起的作用。 抗性品系家蝇对 Pb、SV_1 的 SD 值比正常品系家蝇有显著提高，说明氧化代谢在家蝇对二氯苯醚菊酯抗性中占有重要地位。

2. SV_1、Pb 对家蝇多功能氧化酶的抑制

SV_1、Pb 对家蝇氧化代谢酶系的抑制情况见表 2 和表 3。

表 2　SV_1、Pb 对正常品系和抗性品系家蝇萘羟化活性的抑制

品　系	对照酶活性	IN%			
		SV_1 $2\times10^{-5}M$	SV_1 $8\times10^{-5}M$	Pb $2\times10^{-5}M$	Pb $8\times10^{-5}M$
NP	0.00407±0.00197	25.5	43.7	29.3	47.5
2Cl-R	0.00853±0.00288	9.1	43.4	37.4	67.3

酶活性单位：OD560nm 值/蝇、毫升。
IN%：酶活性抑制百分率。

表 3　正常品系和抗性品系家蝇二氯苯醚菊酯代谢活性比较

	氧化代谢+水解代谢			氧化代谢
	酶 活 性	IN% $2.5\times10^{-4}MSV_1$	IN% $2.5\times10^{-4}M$Pb	
NP	0.536±0.142	65.2	54.9	0.271±0.037
2Cl-R	0.789±0.121	90	56.1	0.403±0.088

酶活表示：代谢量 μg/20 蝇腹 · 小时。
IN%：酶活性抑制百分率。

Oppenoorth (1971) 提出 SV_1 对有机磷的增效是由于它抑制了多功能氧化酶。Ishaaya (1983) 通过比较 SV_1 和 Pb 作用的相似性也证实 SV_1 对拟除虫菊酯的增效与它抑制氧化作用有关。直接测定 SV_1、Pb 对多功能氧化酶的抑制作用表明，SV_1、Pb 在很低浓度下 (10^{-4}mol/L) 就可以对多功能氧化酶催化的萘羟化反应产生抑制作用。SV_1 与 Pb 相比，这种抑制能力稍弱一些，这与毒性测定结果相一致 (0.1% 浓度)。SV_1 与 Pb 一样，在离体情况下可直接抑制二氯苯醚菊酯的氧化代谢。在有氧化酶和水解酶存在的情况下，Pb 可抑制代谢的 55%，而 SV_1 在相同浓度下可抑制代谢的 90%。这是由于前者只抑制二氯苯醚菊酯的氧化代谢，而后者除抑制氧化代谢外，对水解代谢也有抑制作用。这一结果与增效剂施用浓度为 1% 时所获得的增效情况相符合。由此证实 SV_1 对除虫菊酯类氧化代谢的抑制导致它对这类农药的增效。

二氯苯醚菊酯的氧化代谢主要是羟化反应，在醇部分的羟化主要进行环羟化。从多功能氧化酶萘羟化活性、二氯苯醚菊酯整体代谢(氧化代谢加水解代谢)及二氯苯醚菊酯氧化代谢来看，抗性家蝇比正常家蝇酶活性都有显著升高。抗性家蝇酶活性依次为正常的 2、1.47、1.48 倍。这种活性升高与抗性(约 970 倍)相比并不算很大，表明多功能氧化酶活性增强只是引起抗性产生的多种原因之一。

3. SV_1 对正常家蝇和抗性家蝇微粒体细胞色素 P_{450} 的作用

为了进一步了解 SV_1 抑制多功能氧化酶的机制，将 SV_1、Pb 抑制微粒体细胞色素 P_{450} 的情况进行了比较，结果见表 4。

表 4　SV_1、Pb 对家蝇腹部微粒体细胞色素 P_{450} 的活体抑制

处　理		2Cl-R 品系	NP 品系
对　照	$OD_{452-490}$	0.0730±0.0157	0.0550±0.0117
	IN%	0	0
Pb	$OD_{452-490}$	0.0681±0.0178	0.0487±0.0100
	IN%	6.7	11.5
SV_1	$OD_{452-490}$	0.0610±0.0193	0.0510±0.0113
	IN%	16.4	7.3
Pb* (1h)	$OD_{452-490}$	0.0704±0.0183	0.0495±0.0107
	IN%	3.6	10.0
Pb** (2h)	$OD_{452-490}$	0.0643±0.0201	0.0475±0.0107
	IN%	12.0	16.1
SV_1* (1h)	$OD_{452-490}$	0.0616±0.0219	0.0513±0.0114
	IN%	15.7	3.7
SV_1** (2h)	$OD_{452-490}$	0.0601±0.0186	0.0477±0.0126
	IN%	17.7	13.3

* 提前 1 小时滴 10μgSV_1 或 Pb 于家蝇腹部。
** 提前 2 小时滴 10μgSV_1 或 Pb 于家蝇腹部。

SV_1、Pb 活体处理家蝇后，家蝇微粒体细胞色素 P_{450}CO 差光谱明显变小。说明 SV_1 与 Pb 一样，活体处理家蝇可导致微粒体细胞色素 P_{450} 活性下降。Hennssy 等曾提出 Pb 一类的 MDP 化合物在动物体内经活化形成自由基或负碳离子，这些活性分子非竞争性地直接与酶系的某些蛋白位点(如细胞色素 P_{450})结合形成稳定的非活性复合体，使 CO 差光谱变小，影响酶功能发挥导致增效 (Hansen & Hodgson, 1971)。我们测定的 SV_1 作用结果表明，SV_1 的作用方式基本上与 Pb 一样，通过抑制细胞色素 P_{450} 抑制多功能氧化酶。Wilkinson (1971) 曾经提出有机硫逐磷酸酯可作为替代底物对多功能氧化酶活性起抑制作用，这可能也是 SV_1 抑制多功能氧化酶的另一个途径。

比较 SV_1、Pb 对正常家蝇和抗性家蝇微粒体细胞色素 P_{450} 的抑制情况可以看出，SV_1 对抗性家蝇作用较大，而 Pb 对正常家蝇作用较大。表明 SV_1、Pb 对多功能氧化酶的抑制虽与它们和 P_{450} 作用引起 CO 差光谱吸收下降有关，但光吸收下降值与增效作用大小之间关系还有待进一步研究。

已有很多报道指出，有机磷和氨基甲酸酯类农药抗性品系家蝇细胞色素 P_{450}CO 差光谱在吸收值上的升高和 P_{450} 其他光谱学性质的改变，这些变化往往与杀虫剂在昆虫体内和离体匀浆液中氧化代谢的增强有关 (Hodgson & Tate, 1976)。我们所做的正常家蝇和抗性家蝇微粒体 CO 差光谱，有相同的最大吸收波长，但光吸收大小不同。以 CO 差光谱峰值大小作为衡量细胞色素 P_{450} 的标准，则抗性家蝇细胞色素 P_{450} 含量约是正常家蝇的 1.33 倍。这种 P_{450} 在量上的差异与抗性家蝇多功能氧化酶萘羟化活性的增大和对二氯苯醚菊酯离体氧化代谢的增强有很好的一致性，说明微粒体细胞色素 P_{450} 含量的升高导致抗性家蝇氧化代谢能力增强，产生抗药性。

Pb、SV_1 活体处理家蝇后，在 1 小时到 2 小时内，Pb 对正常家蝇的抑制从 10.0% 升到 16.1%，对抗性家蝇的抑制从 3.6% 升到 12.0%，后者增高较明显；SV_1 对正常家蝇抑制从 3.7% 升到 13.3%，对抗性家蝇抑制从 15.7% 升到 17.7%，前者增高较明显。但总的看来，正常家蝇细胞色素 P_{450} 对 Pb 较敏感而抗性家蝇细胞色素 P_{450} 对 SV_1 较敏感。这可能由于二个品系家蝇细胞色素 P_{450} 性质不同或家蝇活体生理状态不同造成。

参 考 文 献

龚坤元 1964 LD_{50} 演算的新发展。«杀虫剂与昆虫毒理进展» 1 (龚坤元等著)。152—197 页。科学出版社。

Brindley, W. A. 1977 Synergist differences as an alternate interpretation of carbaryl-piperonyl butoxide toxicity data. *Environ. Entomol.* **6**: 885.

Dai, S. M. & Sun, C. N. 1984 Pyrethroid resistance and synergism in *Nilaparvata lugen Stål* (Homoptera: Delphacidae) in Taiwan. *J. Econ. Entomol.* **77**: 891.

Feyereisen, R. 1983 Polysubstrate monoxygenases (cytochrome P_{450}) in larvae of susceptible and resistant strains of house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **19**: 262.

Hansen, L. C. & Hodgson, E. 1971 Metabolism of naphthol by enzyme preparations from the housefly, *Musca domestica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1**: 464.

Hodgson, E. & Tate, L. C. 1976 Interaction of insecticides synergists with microsomal mixed function oxidases, In "Insecticide Biochemistry and Physiology", (Wilkinson, C. F. ed) pp 127—135, Plenum Press, New York.

Ishaaya, I. et al. 1983 Synthetic pyrethroids: toxicity and synergism an dietary exposure of *Tricolium castaneum* (Herbst) larvae. *Pestic Sci.* **14**: 367.

Kulkarni, A. P. & Hodgson, E. 1975 Microsomal cytochrome P_{450} from the housefly *Musca domestica* assay and spectral characterization. *Insect Biochem.* **5**: 679.

Omura T. & Sato R. 1964 The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370.

Oppenoorth, F. J. et al. 1971 Synergism of insecticidal action by inhibition of microsomal oxidation with phosphorothionates. *Nature. New Biol.* 223: 187.

Soderlund, D. M. et al. 1983 Metabolism of pyrethrins and pyrethroids in insects, In "Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology", (Hutson, D. H. & Roberts, T. R. ed.) 3: 401—35.

Wilkinson, C. F. 1971 Effects of synergists on the metabolism and toxicity of anticholinesterase. *Bull. Wld Hlth Org.* 44: 171.

PERMETHRIN RESISTANCE AND SV_1 SYNERGISM IN HOUSE FLY (*MUSCA DOMESTICA VICINA*) II. OXIDATIVE METABOLISM

LI JING　FENG GOU-LEI　GONG KUN-YUAN

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing*)

The increasing oxidative metabolism is one of the most important factors in house fly resistance to permethrin. The activity of mixed function oxidases (MFO) to naphthalene and permethrin and the cytochrome P_{450} content in the resistant flies were found to be 2-, 1.48-, 1.33-fold those in the susceptible ones respectively. The sensitivity of cytochrome P_{450} to SV_1 and Pb was also different between the two strains.

SV_1 had strong inhibitory effect to MFO activity of naphthalene hydroxylation and permethrin oxidative metabolism. This is one of the SV_1 synergism mechanisms to permethrin. The SV_1 inhibition to oxidative metabolism is concerned with its effect on microsomal cytochrome P_{450} to form inactive complex.

Key words　housefly——permethrin resistance——MFO——cytochrome P_{450} ——SV_1 inhibition